

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

22. 9. 2004

REC'D 11 NOV 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 8月11日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-291308
[ST. 10/C]: [JP2003-291308]

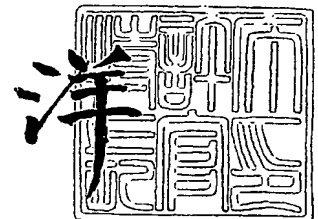
出 願 人
Applicant(s): 三菱レイヨン株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P150468000
【提出日】 平成15年 8月11日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07K 1/00
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 10 番 1 号 三菱レイヨン株式会社
 横浜技術研究所内
 【氏名】 竹内 浩史
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 10 番 1 号 三菱レイヨン株式会社
 横浜技術研究所内
 【氏名】 西嶋 千晴
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市鶴見区大黒町 10 番 1 号 三菱レイヨン株式会社
 横浜技術研究所内
 【氏名】 井関 隆幸
【特許出願人】
 【識別番号】 000006035
 【氏名又は名称】 三菱レイヨン株式会社
 【代表者】 皇 芳之
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 010054
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

アクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩の群から選択される少なくとも1種のモノマーを含むゲル状物に塩化ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

【請求項 2】

ジメチルアクリルアミドを含むゲル状物に2-メチル-2,4-ペンタンジオールが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

【請求項 3】

2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸を含むゲル状物にリン酸ナトリウム/カリウム塩が保持されている蛋白質結晶化剤。

【請求項 4】

メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩を含むゲル状物に、硫酸アンモニウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

【請求項 5】

アクリルアミドを含むゲル状物に、マロン酸ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

【請求項 6】

ポリオキシエチレンモノアクリレートを含むゲル状物にポリエチレングリコール6000が保持されている蛋白質結晶化用ゲル。

【書類名】明細書

【発明の名称】蛋白質結晶化剤およびその調製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛋白質含有試料から蛋白質の結晶を析出させる目的で使用する蛋白質結晶化剤に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、蛋白質の構造を網羅的に解析し、それに基づいて生命現象の仕組みを探索しようとするいわゆる構造ゲノム科学と呼ばれる動きが活発化している。

【0003】

蛋白質の立体構造解析を行うにはその良好な結晶が必要とされ、蒸気拡散法を始めとして様々な結晶化方法が考案されているが、実験操作が煩雑である等依然として課題は多い。これら従来法に変わる新しい結晶化方法や装置の開発が行われている。例えば特許文献1では、沈殿剤や蛋白質をゲル中に含有させ、これらを積層することにより、溶液中で見られる対流を抑えてゲル中で結晶を成長させる方法が提案されている。また、これ以外にも、結晶化方法を簡略化するため、ゲル状物を利用しようとする試みがなされている。

【0004】

さらには、結晶化条件の探索に際して、様々な沈殿化剤が提案されている。

【特許文献1】特開平6-321700号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

しかし、ゲル状物を利用する場合、ゲル状物と沈殿剤の組み合わせによっては、ゲルが白濁したり、ゲル化反応が進行しなかったりという問題があった。

【0006】

ゲルが白濁すれば、結晶化状態の有無を顕微鏡により観察することができず問題となる。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上述した課題を解決するため、本発明者が鋭意検討した結果、蛋白質沈殿剤とゲル状物を構成する成分の組み合わせにより、ゲル化反応が完結し、さらには白濁等を生じないゲル状物を形成するのに重要であることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

即ち、本発明は、(1) アクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩の群から選択される少なくとも1種のモノマーを含むゲル状物に塩化ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル、(2) ジメチルアクリルアミドを含むゲル状物にMPDが保持されている蛋白質結晶化用ゲル、(3) 2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸を含むゲル状物にリン酸Na/Kが保持されている蛋白質結晶化剤、(4) メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩を含むゲル状物に、硫酸アンモニウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル、(5) アクリルアミドを含むゲル状物に、マロン酸ナトリウムが保持されている蛋白質結晶化用ゲル、(6) ポリオキシエチレンモノアクリレートを含むゲル状物にPEG6kが保持されている蛋白質結晶化用ゲル、である。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、ゲル化反応が完結し、さらには白濁等を生じないゲル状物を形成することができ、蛋白質結晶化剤を保持した透明なゲル状物を提供することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、蛋白質結晶化剤、不飽和単量体を含む溶液をゲル化することにより、該蛋白質結晶化剤がゲル中に均一に分散、溶解されたことを特徴とする蛋白質結晶化用ゲルである。

【0011】

蛋白質結晶化剤としては、蛋白質溶液の蛋白質の溶解度を下げることができるものであれば特に限定はない。例えば、塩類として、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、リチウムクロライド、マロン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸リチウム、硝酸ナトリウム、硫酸カドミウム、硫酸ナトリウム等が挙げられる。有機溶媒としては2-メチル-2,4-ペンタンジオール（以下、MPDとする）、エタノール、イソプロパノール、ジオキサン、メタノール、tert-ブタノール、n-プロパノール等が挙げられる。水溶性高分子化合物としては、ポリエチレングリコール（以下、PEGとする）、ポリエチレングリコールモノアルキルエーテル、ポリエチレンイミン等が挙げられる。

【0012】

これらの沈殿剤は、単独もしくは2種類以上の組み合わせで使用することができる。これらの中で、特に、硫酸アンモニウム、塩化ナトリウム、リン酸カリウムナトリウム、リチウムクロライド、マロン酸ナトリウム、MPD、PEGが好適である。

【0013】

市販品として、Emerald BioStructures社製「WIZARD II」、Hampton Research社製「Crystal screen」、「Grid Screen」等を用いることができる。

沈殿剤の使用濃度は、塩類では0.1~5.0mol/Lが好ましく、有機溶媒では1~80体積%が好ましく、水溶性高分子化合物では1~50重量%が好ましい。

【0014】

蛋白質の結晶化は特定のpH領域で行うことが好ましく、pHを維持するために緩衝液を使用しても良い。使用する緩衝液には特に限定はないが、例えば、クエン酸、2-(N-モリホリノ)エタンスルホン酸、N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン、N,N-ビス（ヒドロキシエチル）グリシン等を含有するものが挙げられ、単独もしくは2種類以上の混合物を、必要に応じて酸あるいはアルカリなどで中和し所定のpHに調整する。pHは、3.0~10.0の範囲が好ましく、4.0~9.0の範囲がより好ましい。

本発明において、ゲル化剤として不飽和単量体が使用される。不飽和単量体は、水性媒体中で重合することによりゲル形成が可能なものであれば特に限定はないが、（メタ）アクリルアミド系モノマーや（メタ）アクリル系モノマーであることが好ましい。

【0015】

（メタ）アクリルアミド系モノマーとしては、（メタ）アクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド等のN,N-ジアルキルアミノ（メタ）アクリルアミド、（メタ）アクリルアミドメタンスルホン酸、（メタ）アクリルアミドエタンスルホン酸、2-（メタ）アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸等の（メタ）アクリルアミドアルキルスルホン酸、ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミド、ジエチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミド、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリルアミド等のジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリルアミド、ジメチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミドメチルクロライド塩、ジエチルアミノプロピル（メタ）アクリルアミドメチルエチルクロライド塩、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリルアミドメチルクロライド塩等のジアルキルアミノ（メタ）アクリルアミド4級アンモニウム塩が好適に用いられる。

【0016】

また、（メタ）アクリル系モノマーとしては、2-ヒドロキシエチル（メタ）アクリレート、4-ヒドロキシブチル（メタ）アクリレート、6-ヒドロキシヘキシル（メタ）ア

クリレート、ジエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、トリエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールモノ（メタ）アクリレート等の水酸基含有（メタ）アクリレート、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレート、ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレート等のジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレート、ジメチルアミノエチル（メタ）アクリレートメチルクロライド塩、ジエチルアミノエチル（メタ）アクリレートのエチルクロライド塩等のジアルキルアミノアルキル（メタ）アクリレートの4級アンモニウム塩が好適に用いられる。

【0017】

モノマー濃度は、蛋白質結晶化剤溶液100質量%に対し、0.1～50質量%が好ましく、1～10質量%がより好ましい。

【0018】

また、本発明で必要に応じて使用される上記のモノマーと共重合可能な架橋性モノマーとしては、2官能以上のラジカル重合性基を有する単量体ならば特に限定はないが、例えばN, N'-メチレンビス（メタ）アクリルアミド、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ジエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパントリ（メタ）アクリレート、トリメチロールプロパンエチレンオキサイド変性トリ（メタ）アクリレート等が挙げられるが、特にN, N'-メチレンビス（メタ）アクリルアミド、エチレングリコールジ（メタ）アクリレート、ポリエチレングリコールジ（メタ）アクリレートが好適である。架橋性モノマーの添加量は、（A）群あるいは（B）群のモノマーに対し、0.01～10質量部であり、好ましくは0.1～5質量部である。

【0019】

本発明の蛋白質結晶化剤は、特定の沈殿剤と特定の不飽和単量体とを組み合わせることにより、透明ゲルを得ることができる。ゲルが透明であると、生成した蛋白質結晶の観察が極めて容易となり、光学的検出系による自動化もより容易となる。

【0020】

透明ゲルが得られる不飽和単量体及び蛋白質結晶化剤の組み合わせとしては、（1）アクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸、メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩の群から選択される少なくとも1種のモノマーと塩化ナトリウム、

（2）ジメチルアクリルアミドとMPD、

（3）2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸リとリン酸Na/K、（4）メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩と硫酸アンモニウム、（5）アクリルアミドとマロン酸ナトリウム、

（6）ポリオキシエチレンモノアクリレートとPEG6k、
である。

【0021】

本発明の蛋白質結晶化剤は、少なくとも沈殿剤、緩衝液、不飽和単量体を含有してなる水溶液を熱重合させるか、もしくは熱および／または光ラジカル重合開始剤存在下に重合させることによりゲル化させ、沈殿剤をゲル中に均一に保持させることにより調製することができる。ラジカル重合開始剤存在下に重合を行うのが好適である。水溶液中において好適に使用されるラジカル重合開始剤としては、例えば、tert-ブチルハイドロパーオキサイド、過酸化水素、過硫酸アンモニウム、過硫酸カリウム等の過酸化物、2, 2'-アゾビス（2-アミジノプロパン）2塩酸塩、2, 2'-アゾビス（2-アミジノブタン）2塩酸塩、2, 2'-アゾビス〔2-（2-イミダゾリン-2-イル）プロパン〕2塩酸塩等のアゾ系重合開始剤が挙げられる。これらのラジカル重合開始剤は、単独もしくは2種類以上の混合物として使用することができる。また、前記の過酸化物に第三級アミン、亜硫酸塩、第1鉄塩等の還元剤を組み合わせたレドックス系重合開始剤、さらには、レドックス系重合開始剤とアゾ系重合開始剤を組み合わせた併用重合開始剤を使用してもよい。

【0022】

また、特定波長の光を与える光源下で、光ラジカル重合開始剤を用いて重合を行うこともできる。その際、使用される光ラジカル重合開始剤は、特定波長の範囲内の光照射により分解し、ラジカルを発生するものであれば特に限定はないが、好適に利用できるものとして、例えば、アシルホスフィンオキサイド、ベンゾイン、ベンゾインアルキルエーテル、ベンジル、ベンゾフェノン、アントラキノン等の通常光重合に使用される開始剤、その他に、2, 2'-アゾビス(2-メチルプロピオンアミジン)塩酸塩、4, 4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)ナトリウム塩、2, 2'-アゾビス[2-メチル-N-(2-ヒドロキシエチル)プロピオンアミド]等のアゾ系重合開始剤が挙げられる。これらのうちから、利用する光波長に応じて、任意のものを1種類以上を選択し使用することができる。また、前記の特定波長とは、反応液中に含有される単量体自身による光吸収、ラジカル生成に利用される光量子エネルギーの二つの点を考慮すると、波長が200~650 nmの領域の光を用いることが望ましい。波長が200~650 nmの領域の光照射に利用可能な光源の代表例としては、高圧水銀ランプ、低圧水銀ランプ、メタルハライドランプ、蛍光ケミカルランプ、蛍光青色ランプ等が挙げられる。

【実施例】

【0023】

以下、実施例により本発明を詳細に説明する。緩衝液は以下のものを使用し、常法に従って調製した。

【0024】

- 0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 4.0)、
- 0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 5.0)、
- 0.1 M-MES (pH 6.0)、
- 0.1 M-HEPES (pH 7.0)
- 0.1 M-Tris (pH 8.0)、
- 0.1 M-Bicine (pH 9.0)

<実施例1>

沈殿剤である塩化ナトリウム0.48 gを10 mlメスフラスコに秤量し、0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で定容して1.2 M-NaCl水溶液(これをa液とする)を調製した。また、50%アクリルアミド水溶液(三菱レイヨン製)90 gにN, N'-メチレンビスアクリルアミド(以下、MBA_{Am}と略す)5 g、脱イオン水5 gを加えて溶解し、50%モノマー溶液(これをb液とする)を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2, 2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩(和光純薬工業製、VA-044)の10%水溶液(これをc液とする)を調製した。2 mlのサンプルチューブに、a液を840 μ l、b液を160 μ l注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液(1.0 M-NaCl、pH 4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更にc液を10 μ l添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

【0025】

前記の手順でハイドロゲルを形成したサンプルチューブに、40 mg/mlのリゾチーム水溶液1 mlを加え、20℃で24時間インキュベートしたところ、リゾチーム水溶液中にリゾチーム結晶が析出していた。尚、結晶生成は肉眼および実体顕微鏡で確認した。

【0026】

<実施例2>

実施例1において、a液の濃度2.4 Mに変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液(2.0 M-NaCl、pH 4.0、モノマー濃度8%)を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表-1に示す。

【0027】

<実施例 3>

実施例 1 において、a 液の濃度 3.6 M に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (3.0 M-NaCl、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

【0028】

<実施例 4>

実施例 1 において、a 液の濃度 4.8 M に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (4.0 M-NaCl、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

【0029】

<実施例 5～8>

実施例 1～4 において、緩衝液を 0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 5.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

【0030】

<実施例 9～12>

実施例 1～4 において、緩衝液を 0.1 M-MES 緩衝液 (pH 6.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

【0031】

<実施例 13～16>

実施例 1～4 において、緩衝液を 0.1 M-HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

【0032】

<実施例 17～20>

実施例 1～4 において、緩衝液を 0.1 M-Tris 緩衝液 (pH 8.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

【0033】

<実施例 21～24>

実施例 1～4 において、緩衝液を 0.1 M-Bicine 緩衝液 (pH 9.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

【0034】

<実施例 25>

沈殿剤であるポリエチレングリコール (和光純薬工業製、PEG 6000、重量平均分子量：6000) 0.55 g を 10 ml メスフラスコに秤量し、0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で定容して 5.5%-PEG 水溶液 (これを d 液とする) を調製した。また、ポリエチレングリコールモノアクリレート (日本油脂製ブレンマー AE90) 95 g に、ポリエチレングリコールジアクリレート (新中村化学製 NKESTERA-200) を溶解したモノマー溶液 (これを e 液とする) を調製した。更に、水溶性重合開始剤である 2, 2'-アゾビス [2- (2-イミダゾリン-2-イル) プロパン] 二塩酸塩 (和光純薬工業製、VA-044) の 10% 水溶液 (これを c 液とする) を調製した。2 ml のサンプルチューブに、a 液を 920 μ l、b 液を 80 μ l を注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液 (5%-PEG、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に c 液を 10 μ l 添加してよく混合した後、55℃の温浴で 3 時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。以下、実施例 1 と同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表—1 に示す。

す。

【0035】

<実施例 26>

実施例 25 において、d 液の濃度を 11% に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (10%-PEG、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【0036】

<実施例 27>

実施例 25 において、d 液の濃度を 22% に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (20%-PEG、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【0037】

<実施例 28>

実施例 25 において、d 液の濃度を 33% に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液 (30%-PEG、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【0038】

<実施例 29~32>

実施例 25~28 において、緩衝液を 0.1M-クエン酸緩衝液 (pH 5.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【0039】

<実施例 33~36>

実施例 25~28 において、緩衝液を 0.1M-MES 緩衝液 (pH 6.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【0040】

<実施例 37~40>

実施例 25~28 において、緩衝液を 0.1M-HEPES 緩衝液 (pH 7.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【0041】

<実施例 41~44>

実施例 25~28 において、緩衝液を 0.1M-Tris 緩衝液 (pH 8.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【0042】

<実施例 45~48>

実施例 25~28 において、緩衝液を 0.1M-Bicine 緩衝液 (pH 9.0) に変更した以外は同様の手順で、結晶化剤水溶液を調製し、更に同様の手順で透明なハイドロゲルを得た。また、同様の方法でリゾチーム結晶の生成を確認した。結果を表 1 に示す。

【表 1】

	沈殿剤	モノマー	pH	ゲル性状	蛋白質結晶化状態
実施例 1	1.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶
実施例 2	2.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例 3	3.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例 4	4.0M-NaCl	アクリルアミド	4.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例 5	1.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	結晶
実施例 6	2.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	結晶
実施例 7	3.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例 8	4.0M-NaCl	アクリルアミド	5.0	透明ゲル	沈殿
実施例 9	1.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	結晶
実施例 10	2.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	結晶
実施例 11	3.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例 12	4.0M-NaCl	アクリルアミド	6.0	透明ゲル	沈殿
実施例 13	1.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	結晶
実施例 14	2.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	結晶
実施例 15	3.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例 16	4.0M-NaCl	アクリルアミド	7.0	透明ゲル	沈殿
実施例 17	1.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例 18	2.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例 19	3.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例 20	4.0M-NaCl	アクリルアミド	8.0	透明ゲル	結晶
実施例 21	1.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	結晶
実施例 22	2.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	結晶
実施例 23	3.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	沈殿
実施例 24	4.0M-NaCl	アクリルアミド	9.0	透明ゲル	沈殿
実施例 25	5%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 26	10%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 27	20%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	結晶
実施例 28	30%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	4.0	透明ゲル	結晶
実施例 29	5%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶
実施例 30	10%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶
実施例 31	20%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶
実施例 32	30%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	5.0	透明ゲル	結晶、沈殿混合物
実施例 33	5%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 34	10%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 35	20%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 36	30%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	6.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 37	5%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 38	10%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 39	20%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 40	30%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	7.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 41	5%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 42	10%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 43	20%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 44	30%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	8.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 45	5%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 46	10%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 47	20%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし
実施例 48	30%-PEG	ポリエチレングリコールモノアクリレート	9.0	透明ゲル	生成物なし

<実施例 49>

沈殿剤である塩化ナトリウム 0.48 g を 10 ml メスフラスコに秤量し、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で定容して 1.2 M-NaCl 水溶液 (これを a 液とする) を調製した。

【0043】

また、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸 47.5 g に N, N'-メチレンビスアクリルアミド (以下、MBAAm と略す) 2.5 g、脱イオン水 50 g を加えて溶解し、50%モノマー溶液 (これを b 液とする) を調製した。更に、水溶性重合開始剤である 2, 2'-アゾビス [2- (2-イミダゾリン-2-イル) プロパン] 二塩酸塩 (和光純薬工業製、VA-044) の 10% 水溶液 (これを c 液とする) を調製した。2 ml のサンプルチューブに、a 液を 840 μ l、b 液を 160 μ l 注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液 (1.0 M-NaCl、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に c 液を 10 μ l 添加してよく混合した後、55℃の温浴で 3 時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

【0044】

<実施例 50>

沈殿剤である塩化ナトリウム 0.48 g を 10 ml メスフラスコに秤量し、0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で定容して 1.2 M-NaCl 水溶液 (これを a 液とする) を調製した。

【0045】

また、80%メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩水溶液 62.5 g に N, N'-メチレンビスアクリルアミド (以下、MBAAm と略す) 2.5 g、脱イオン水 35 g を加えて溶解し、50%モノマー溶液 (これを b 液とする) を調製した。更に、水溶性重合開始剤である 2, 2'-アゾビス [2- (2-イミダゾリン-2-イル) プロパン] 二塩酸塩 (和光純薬工業製、VA-044) の 10% 水溶液 (これを c 液とする) を調製した。2 ml のサンプルチューブに、a 液を 840 μ l、b 液を 160 μ l 注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液 (1.0 M-NaCl、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に c 液を 10 μ l 添加してよく混合した後、55℃の温浴で 3 時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

【0046】

<実施例 51>

沈殿剤で 2-メチル-2,4-ペンタンジオール 2 g を 10 ml メスフラスコに秤量し、0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で定容して 20%-2-メチル-2,4-ペンタンジオール水溶液 (これを a 液とする) を調製した。

【0047】

また、ジメチルアクリルアミド 47.5 g に N, N'-メチレンビスアクリルアミド (以下、MBAAm と略す) 2.5 g、脱イオン水 50 g を加えて溶解し、50%モノマー溶液 (これを b 液とする) を調製した。更に、水溶性重合開始剤である 2, 2'-アゾビス [2- (2-イミダゾリン-2-イル) プロパン] 二塩酸塩 (和光純薬工業製、VA-044) の 10% 水溶液 (これを c 液とする) を調製した。2 ml のサンプルチューブに、a 液を 840 μ l、b 液を 160 μ l 注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液 (1.0 M-NaCl、pH 4.0、モノマー濃度 8%) を調製し、更に c 液を 10 μ l 添加してよく混合した後、55℃の温浴で 3 時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

【0048】

<実施例 52>

沈殿剤であるリン酸ナトリウム塩 1.176 g、リン酸カリウム塩 0.035 g を 10 ml メスフラスコに秤量し、0.1 M-クエン酸緩衝液 (pH 4.0) で定容して 1.0 M-リン酸ナトリウム/カリウム塩水溶液 (これを a 液とする) を調製した。

【0049】

また、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸 47.5 g に N, N'-メチレンビスアクリルアミド (以下、MBAAm と略す) 2.5 g、脱イオン水 50 g を加えて溶解し、50%モノマー溶液 (これを b 液とする) を調製した。更に、水溶性重合開始剤である 2, 2'-アゾビス [2- (2-イミダゾリン-2-イル) プロパン] 二塩酸塩 (和光純薬工業製、VA-044) の 10% 水溶液 (これを c 液とする) を調製した。2 ml のサンプルチューブに、a 液を 840 μ l、b 液を 160 μ l 注入して混合し、蛋白質結

晶化剤水溶液（1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%）を調製し、更にc液を10 μ l添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

【0050】

<実施例53>

沈殿剤である硫酸アンモニウム3.17gを10mlメスフラスコに秤量し、0.1M-クエン酸緩衝液（pH4.0）で定容して2.4M-硫酸アンモニウム水溶液（これをa液とする）を調製した。

【0051】

また、80%メタクリルジメチルアミノエチルメチルクロライド塩水溶液62.5gにN,N'-メチレンビスアクリルアミド（以下、MBAAmと略す）2.5g、脱イオン水35gを加えて溶解し、50%モノマー溶液（これをb液とする）を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩（和光純薬工業製、VA-044）の10%水溶液（これをc液とする）を調製した。2mlのサンプルチューブに、a液を840 μ l、b液を160 μ l注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液（1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%）を調製し、更にc液を10 μ l添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

【0052】

<実施例54>

沈殿剤であるマロン酸1.04gを10mlメスフラスコに秤量し、20%-水酸化ナトリウム水溶液4gを加えて中和したのち、0.1M-クエン酸緩衝液（pH4.0）で定容して1.0M-マロン酸ナトリウム水溶液（これをa液とする）を調製した。

【0053】

また、50%アクリルアミド水溶液（三菱レイヨン製）90gにN,N'-メチレンビスアクリルアミド（以下、MBAAmと略す）5g、脱イオン水5gを加えて溶解し、50%モノマー溶液（これをb液とする）を調製した。更に、水溶性重合開始剤である2,2'-アゾビス[2-(2-イミダゾリン-2-イル)プロパン]二塩酸塩（和光純薬工業製、VA-044）の10%水溶液（これをc液とする）を調製した。2mlのサンプルチューブに、a液を840 μ l、b液を160 μ l注入して混合し、蛋白質結晶化剤水溶液（1.0M-NaCl、pH4.0、モノマー濃度8%）を調製し、更にc液を10 μ l添加してよく混合した後、55℃の温浴で3時間重合し、透明なハイドロゲルを得た。

【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 蛋白質の溶解度を低下させる沈殿剤を予めゲル中に保持させることにより、より簡便な方法で蛋白質の結晶化操作を行うことが可能である蛋白質結晶化剤の提供。

【解決手段】 蛋白質沈殿剤、不飽和単量体を含有してなる溶液をゲル化させることにより、該結晶化剤がゲル中に均一に保持されたことを特徴とする蛋白質結晶化剤。本発明の蛋白質結晶化剤は、特定の沈殿剤と不飽和単量体とを組み合わせることにより、透明ゲルを得ることができる。ゲルが透明であると、生成した蛋白質結晶の観測が極めて容易となり、光学的検出系による自動化もより容易となる。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 2 9 1 3 0 8

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [0 0 0 0 0 6 0 3 5]

1. 変更年月日	1 9 9 8 年 4 月 2 3 日
[変更理由]	住所変更
住 所	東京都港区港南一丁目 6 番 4 1 号
氏 名	三菱レイヨン株式会社